

Aflatoxin B₁ 및 D-Galactosamine이 Diethylnitrosamine으로 유도된 흰쥐 간의 태반형 Glutathione S-Transferase 양성변이소의 항진효과에 미치는 영향

서울대학교 의과대학 병리학교실

이 혜 경* · 김 용 일

Promoting Effect of Aflatoxin B₁ and D-Galactosamine on Development of Glutathione S-Transferase Positive Foci in Diethylnitrosamine-initiated Rat Liver

Hye Kyung Lee, M.D. and Yong Il Kim, M.D.

Department of Pathology Seoul National University College of Medicine

The enhancing potential of aflatoxin B₁ (AFB₁) and D-galactosamine (DGA) on development of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive (GST-P⁺) hepatic foci was examined using an in vivo mid-term assay system based on two-stage concept of hepatocarcinogenesis.

Rats were initially given a single dose (200 mg/kg) of diethylnitrosamine (DEN) intraperitoneally, and thereafter, with an interval of 2 weeks, AFB₁ at a graded concentration (0.06, 0.012, 0.0024, 0.00048, and 0.000096 mg/kg i.g.) and DGA (100 mg/kg i.p.) were administered for 6 weeks and then sacrificed. All rats were subjected to a two-thirds partial hepatectomy to induce a potent growth stimulus to DEN-altered hepatocytes at the week 3. The modifying potential was scored by comparing the number and the area (mm²) per cm² of GST-P⁺ foci in the liver with those of the corresponding control group given DEN alone. AFB₁ (at a graded concentration between 96 ng/kg and 60 µg/kg) exerted a strong promoting effect on induction of GST-P⁺ foci with both the number and the area. The logarithmic dose of AFB₁ and the potency to promote hepatocarcinogenesis were in dose-dependent relationship. DGA, a known necrogenic chemical to cause periportal necrosis and stimulate hepatocellular proliferation, also revealed the increase in the area of GST-P⁺ foci, although its enhancing potential was less profound than that of AFB₁. The results suggest that DGA is also a useful proliferative stimulus to improve the medium-term detection of unknown carcinogens. (**Korean J Pathol 1994; 28: 389~398**)

Key Words: Aflatoxin B₁, D-Galactosamine, GST-P⁺ foci, Hepatocarcinogenesis

서 론

최근 발암 2단계설을 응용하여 각종 화학물질들의

접 수: 1991년 3월 22일, 게재승인: 1994년 5월 30일
주 소: 서울 종로구 연건동 28번지, 우편번호 110-744
서울대학교 의과대학 병리학교실, 김용일

*현재 인제대학교 의과대학 서울백병원 해부병리과

간발암 수식효과를 규명하려는 동물실험이 활발히 진행되고 있으며¹⁻⁶⁾, 이를 위하여 Solt-Farber 간암유도모델⁷⁾을 기초로 수정 변형한 방법들이 널리 적용되고 있다. 즉 diethylnitrosamine(이하 DEN이라 함)과 같이 원하는 장기에 표적성을 가진 발암물질은 초발인자로 정하여 전암성변인이 유도되는 양을⁸⁾ 1회 투여한 다음, 각종 시험하고자 하는 화학물질들을 장기간에 걸쳐 지속적으로 투여함과 더불어 증식자극으로서 부분적간절제술을 시행한 후 전암성변인으로 알

려진^{4,8,9)} 효소변이소(enzyme altered focus) 혹은 증식성결절(hyperplastic nodule)이 출현하는 빈도를 대조군과 비교 검색하는 방법이다. 이때 전암성병변의 발생은 조직내에서 γ -glutamyl transpeptidase(이하 GGT라 함)^{2,7)} 혹은 태반형 glutathione S-transferase(이하 GST-P라 함)¹⁰⁻¹⁵⁾ 양성변이소를 면역조직화학적으로 인지함으로써 확인할 수 있고, 그 수와 면적을 계측하여 대조군과 비교함으로써 각종 화학물질들의 간발암 수식효과를 판정할 수 있다.

Aflatoxin B₁(이하 AFB₁이라 함)은 *Aspergillus flavus*가 만드는 진균성 독소로서 강력한 간독성은 물론 간발암성을 가지고 있음이 흰쥐를 비롯한 동물실험모델에서 이미 입증된 바 있다¹⁶⁻²³⁾. 특히 우리나라에서는 제주에서 *Aspergillus flavus*가 검출되고 있으며 AFB₁의 오염이 강력히 시사됨으로써 간세포암종 발생의 주요인자로 주목을 받아 왔다. 또한 최근 B형간염바이러스 단독에 의한 간세포암종 발생 이외에도 AFB₁의 첨가적 역할이 새롭게 주목을 받게 됨으로써²⁴⁾ 촉진인자로서의 AFB₁의 발암 관여에 대한 가능성 검토가 요청된다.

세포의 증식성자극이 간발암기전의 여러 단계에서 핵심적 역할을 담당함은 이미 잘 알려진 사실이며^{25,26)}, 특히 발암 2단계설에 적용시켜 볼 때 세포증식을 촉진시키는 물질들은 대부분 초발과정^{8,27,28)}과 촉진과정^{26,28,29)} 단계에서 발암과정에 촉진적으로 작용함이 밝혀졌다. 한편 Keppler등은 간괴사제인 D-galactosamine(이하 DGA라 함)을 흰쥐의 복강내에 주사함으로써 형태학적으로 인체의 급성바이러스성간염과 매우 유사한 실험적 간염을 보고한 바 있다³⁰⁻³³⁾. 또한 Tsuda등³⁴⁾은 사염화탄소와 DGA를 Solt-Farber의 간암유도모델에서 부분적간절제술 대신 1회 복강내에 주입함으로써 DGA가 부분적간절제술에 버금가는 강력한 발암 촉진작용이 있음을 시사하였다. 그러나 간암유도모델과 연계하여 DGA의 지속적 투여로 인한 실험적 간염의 형태학적 연구 및 발암 수식효과에 대한 연구는 아직 없다.

본 연구에서는 AFB₁ 및 DGA의 간발암 수식효과를 실험적으로 규명하고자 Solt-Farber의 간암유도모델⁷⁾을 약간 수정한 DEN + AFB₁ 혹은 DGA + 부분적간절제술의 방식을 택하여 GST-P 양성 전암성 효소변이소를 유도해 내고 이를 대조군과 비교 검색함으로써 농도별 AFB₁ 및 DGA의 촉진인자로서의 간발암 수식효과를 확인하고자 하였다.

연구재료 및 방법

1. 실험 동물

실험에 사용한 동물은 생후 6주된 Sprague-Dawley계 숫컷 흰쥐 160마리(체중 170~200 gm)를

대상으로 하였다. 실험기간 중 고형사료와 물은 자유로이 먹게 하였으며, 모든 동물은 희생시키기 24시간 전부터 사료를 주지 않았다.

2. 시 약

본 연구에 사용된 시약들 중 DEN, AFB₁, DGA, dimethylsulfoxide(이하 DMSO라 함), Tris-buffer, 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(이하 DAB라 함)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 가토 항-흰쥐 태반형 glutathione S-transferase 항체(rabbit anti-rat GST-P)는 일본 Hirosaki대학 의학부 제2생화학교실의 Kiyomi Sato교수로부터 공여받아 사용하였으며, 면양 항-가토 IgG 항체(비오틴화 이차항체)와 Vectastain ABC kit(Elite, PK-6101)는 Vector Labs.(Burlingame, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Acetone은 Meck Co.(Darmstadt, West Germany)로부터 구입하였고, benzene과 hydrogen peroxide는 Hori Co.(Osaka, Japan)로부터 구입하여 사용하였다. 기타 화학약품들은 시중에서 analytical grade의 제품을 구입하여 사용하였다.

3. 실험 원안

1) 실험군 및 간암발생유도: 본 연구의 실험군은 모두 9군으로서 각군마다 18마리의 흰쥐를 배정하였다. 간암발생유도는 Solt-Farber의 방법⁷⁾을 약간 수정하여 다음과 같이 기획하였다(Fig.1). 즉 제1군부터 제5군까지는 처음에 DEN 200 mg/kg 용량을 0.9% NaCl용액에 용해시켜 복강내로 1회 주입하였고, 2주 후부터 AFB₁을 주 5회 매일 튜브를 통해 6주 동안 위에 주입하였다. AFB₁은 분말 1 mg당 1 ml의 DMSO에 용해시킨 후 증류수로 희석하여 사용하였으며, 그 용량은 제1군에서부터 제5군까지 순서대로 각각 0.06, 0.012, 0.0024, 0.00048, 0.000096 mg/kg씩 투여하였다. 제6군은 처음에 DEN을 상기 방법과 마찬가지로 복강내로 1회 주입하고, 2주 후부터 DGA 100 mg/kg 용량을 0.9% NaCl용액에 용해시켜 6주 동안 주 5회 매일 복강내에 주사하였다. 제7군은 대조군으로서 처음에 DEN만 상기 방법에 따라 복강내로 1회 주입하였다. 제8, 9군 역시 대조군들로서 처음에 DEN대신 0.9% NaCl 용액을 복강내에 1회 주입하였다. 2주 후부터 제8군에서 AFB₁ 0.06 mg/kg 용량을 제1군과 같이 튜브를 통해 위에 주입하였고, 제9군에서는 DGA 100 mg/kg 용량을 제6군과 같이 복강내로 주사하였다.

모든 실험군은 제3주에 ether 마취하에 Higgins와 Anderson의 방법³⁵⁾으로 중앙엽과 좌측엽의 기저부를 3-0 용합사로 결찰한 후 절제하였으며 67% 부분적간절제술이 되었다.

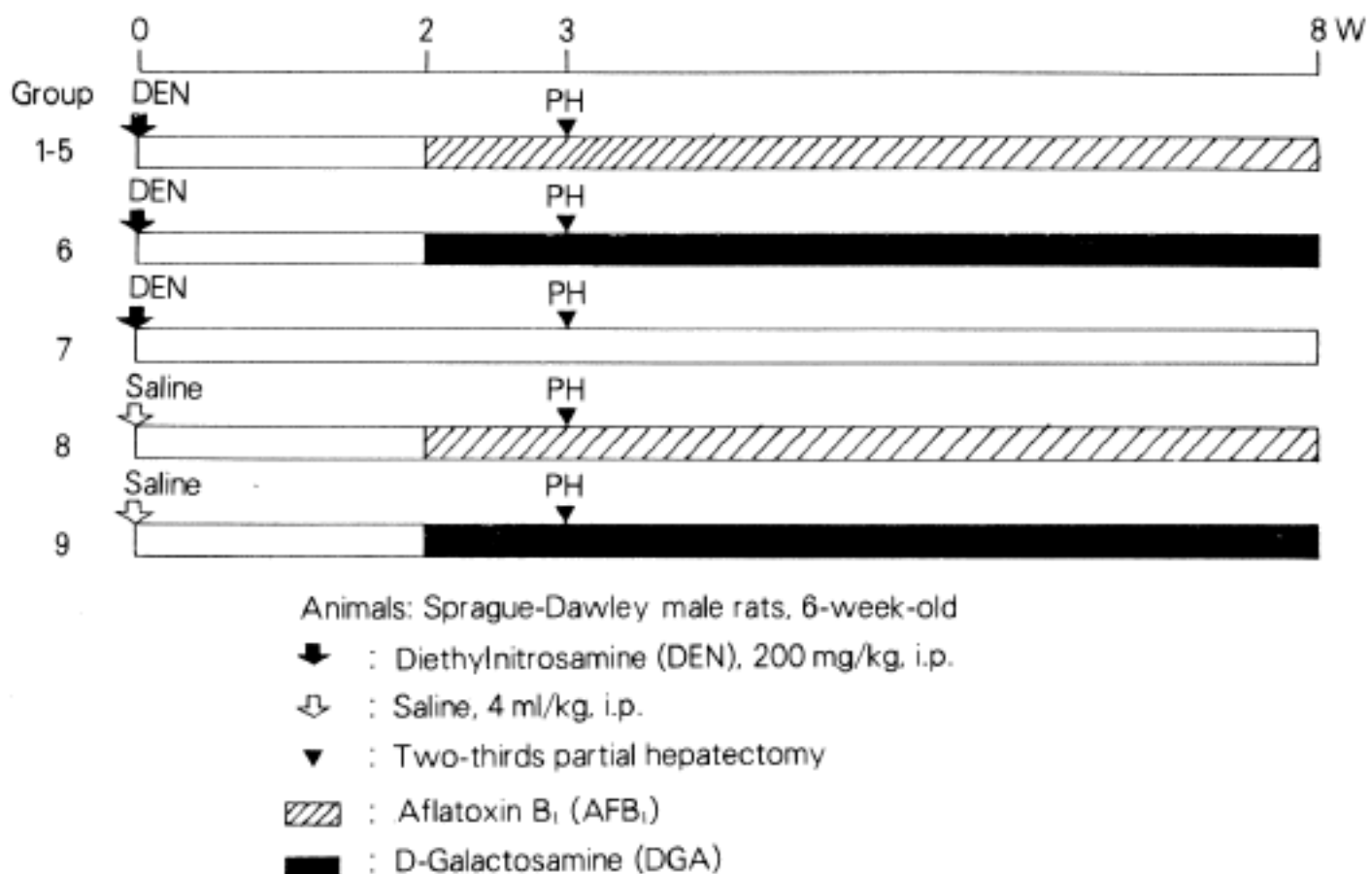


Fig. 1. Experimental design.

Group 1~5. DEN + AFB₁; Group 6. DEN + DGA;
 Group 7. DEN alone; Group 8. AFB₁ alone; Group 9. DGA alone.
 All rats were subjected to PH at week 3.

4. GST-P 양성변이소의 병리조직학적 검색

1) **흰쥐 간조직 채취 및 광학현미경적 표본제작:** 모든 동물은 제 8 주에 경추탈골방법으로 희생시켰다. 희생 즉시 간을 적출하여 에리한 양면 면도날로 간조직을 1~2 mm 두께로 절단한 후 우후엽과 미엽에서 각각 1개씩, 우전엽에서 2개씩의 절편을 일정하게 채취하여 4°C의 acetone액과 10% 중성 완충 formalin 액에 고정시켰다. Acetone은 하루에 2번씩 신선한 용액으로 교체하였으며, 3일동안 조직을 충분히 고정, 탈수시킨 후에 benzene 용액에 2시간마다 3번씩 단계적으로 투명시켰다. 이어 통상의 방법으로 파라핀을 침투시키고 포매하여 블록을 제작하였다. 이때 용해 파라핀의 온도는 항상 58°C 이하로 유지하였다. 파라핀 블록들은 4μm 두께로 2회 연속박절한 후 일부는 통상적인 방법에 따라 hematoxylin-eosin염색을 시행하였고, 일부는 GST-P 양성변이소에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하였다.

2) **면역조직화학적 염색:** GST-P 양성변이소의 염색은 Vectastain ABC kit(Elite)를 사용하여 avidin-biotin-peroxidase complex(ABC)법³⁶⁾에 의해 시행하였다. 가토 항-흰쥐 태반형 GST 항체(일차항체)는 Tris-buffered saline(0.1 M, pH7.5)(이하

TTBS라 함)로 6000배 희석하여 30분간 실온에서 반응시킨 후, 면양에서 만든 항-가토 IgG 항체(비오틴화 이차항체)(1:10000)로 30분간 처리하였다. Vectastain(Elite) avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 시약(1:2500)으로 30분간 처리한 후 DAB로 발색시킨 다음 Mayer's hematoxylin으로 대조핵 염색을 하였다.

3) **GST-P 양성변이소의 계측:** 최대직경이 0.2 mm 보다 큰 GST-P 양성변이소의 수(number), 면적(area) 및 최대직경(maximum diameter)은 비데오영상분석기(Video image processor)(VIDAS, Zeiss, West Germany)를 통하여 측정하였고, 여기서 변이소의 평균 최대직경, 절편 슬라이드 cm²당 변이소의 수(number/cm²) 및 면적(area(mm²)/cm²)으로 산출하여 각 실험군별로 비교하였다. 비데오영상분석기로 계측시 실험군 간의 차이에 유념하지 않고 측정하였다. 계측자료에 대한 통계학적 분석은 Student's t-test와 ANOVA(one-way)에 적용시켰다.

연구 성적

1. 흰쥐 간암유도모델에서의 생존율 및 체중변화

실험 마지막날에 각군별로 측정된 흰쥐 1마리당 평

Table 1. Mean final body weight and total administration of Aflatoxin B₁ or D-galactosamine in each experimental group

Group	Treatment(mg/kg)	Effective No.of rats	Body weight*(gm)	Total administration of AFB ₁ or DGA(mg/kg)
1	DEN + AFB ₁ 0.06	9	385 ± 31.6	1.8
2	DEN + AFB ₁ 0.012	9	395 ± 28.8	0.36
3	DEN + AFB ₁ 0.0024	8	373 ± 33.2	0.072
4	DEN + AFB ₁ 0.00048	10	402 ± 38.7	0.0144
5	DEN + AFB ₁ 0.000096	11	399 ± 41.6	0.00288
6	DEN + DGA 100	9	390 ± 35.5	3000
7	DEN	9	401 ± 27.9	-
8	SAL + AFB ₁ 0.06	12	388 ± 34.6	1.8
9	SAL + DGA 100	13	390 ± 42.8	3000

*Mean ± Standard deviation

DEN; Diethylnitrosamine, AFB₁; Aflatoxin B₁, DGA; D-galactosamine, SAL; Saline

균 체중 및 AFB₁ 또는 DGA의 총투여량은 Table 1과 같다. 흰쥐의 생존율은 50~61% 정도로 비교적 낮았으나 실험군 간에 유의한 차이는 없었다(p>0.05). 실험기간 중에 사망한 흰쥐의 주된 사인은 부분적간절제술시의 마취사고 및 출혈로 인한 수술후 합병증 등이었다. 흰쥐의 평균 체중 역시 실험군 간에 유의한 차이가 없었다(p>0.05).

2. GST-P 양성변이소의 광학현미경적 소견

H&E 염색표본에서 변이소내 간세포의 핵은 정상 간세포와 같거나 약간 크고 과염색질성(vesicular)이었으며, 1개의 크고 뚜렷한 핵소체를 가지고 있었다. 유사분열상은 정상 간조직내에서는 찾아 볼 수 없었으나 변이소 내부에서는 간혹 1개 정도 관찰되었다. 세포질의 성상에 따라 변이소를 투명세포변이소(clear cell focus), 호산성세포변이소(eosinophilic cell focus) 및 혼합세포변이소(mixed cell focus)의 3종류로 나눌 수 있었으며, 그 분류 기준은 ILAR(Institute of Laboratory Animal Resources)(1980)에 근거하였다. 다만 호염기성세포변이소(basophilic cell focus)는 전실험군에 걸쳐 찾아 볼 수 없었다.

1) 투명세포변이소의 구성 세포들은 핵 주위의 세포질이 전반적으로 투명하여 마치 식물세포를 보는 듯한 인상이었으며, PAS 및 D-PAS 염색표본에서 세포질내에 풍부한 당원질을 함유하고 있었다. 세포 1개의 크기는 130~180 μm 정도로 정상 간세포와 비슷하거나 약간 커져 있었다.

2) 호산성세포변이소내의 세포들은 호산성으로 진하게 염색되는 과립성세포질로 인하여 ground glass 양상을 보이고 있었으며(Fig. 2), 세포 1개의 크기가 150~200 μm 정도로 정상 간세포보다 약간 커져 있었고, 세포질내에 간혹 원형 또는 난원형의 초자양 소

적으로 보이는 봉입체(5~30 μm)를 함유하고 있었다.

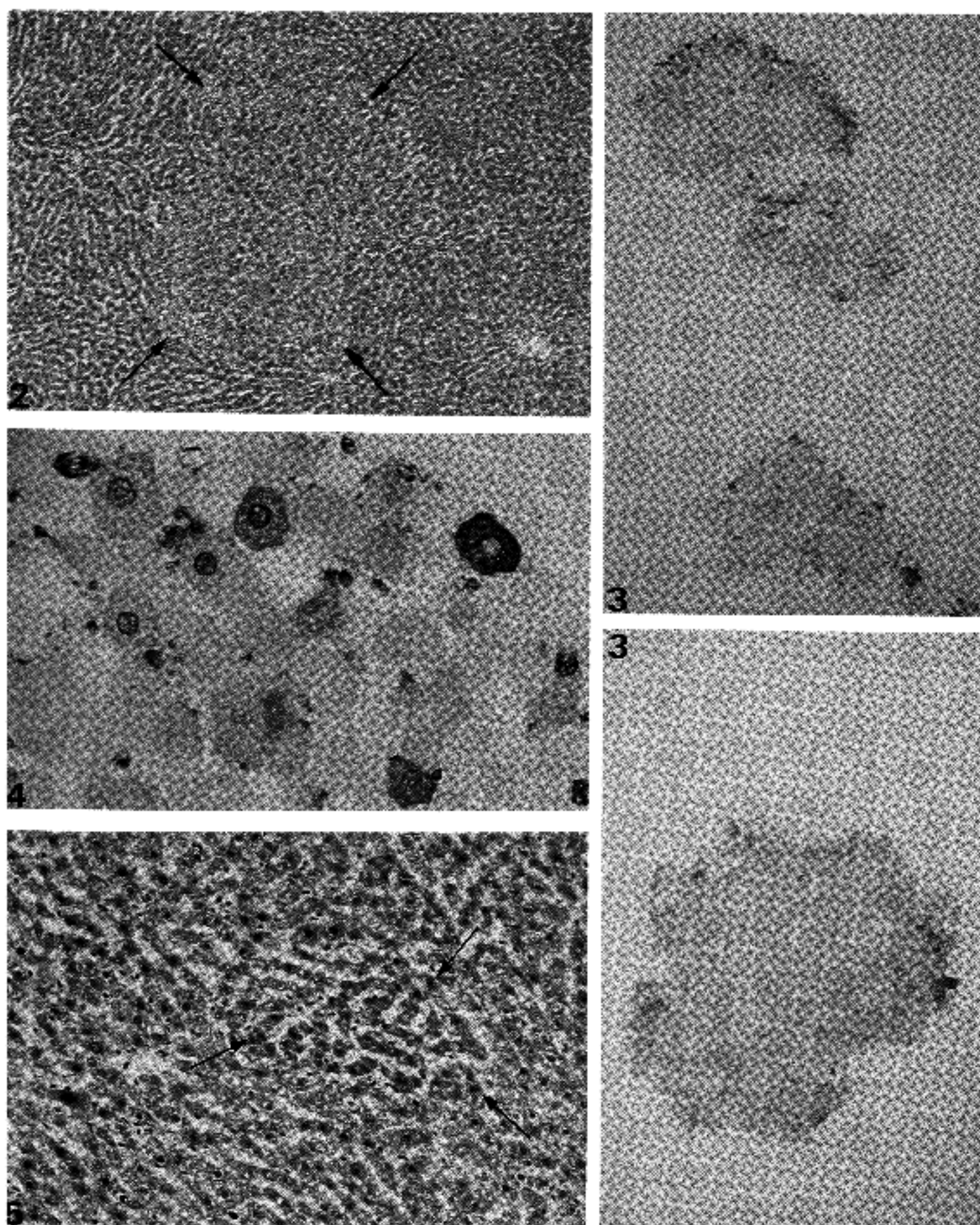
3) 혼합세포변이소는 투명세포와 호산성세포가 불규칙하게 혼재되어 있었으며, 호산성세포변이소에서와 같은 세포질성 봉입체를 간혹 볼 수 있었다.

가토 항-흰쥐 GST-P 항체(일차항체)와 면양 항-가토 IgG 항체(비오틴화 이차항체) 및 avidin-biotin-peroxidase complex(ABC)를 순서대로 반응시킨 후 DAB로 발색시켜 본 결과, 최대직경이 0.2 mm보다 큰 GST-P 양성변이소는 제 1~7 실험군에서 다발성으로 산재해 있었다. 그 분포상은 Rappaport의 acinus 개념을 기준으로 할때 주로 Zone 2(68~88%)에 분포하고 있었으며, 그 나머지의 대부분은 문맥 주위의 Zone 1(13~30%)에 분포하고 있었고, 중심정맥 주위의 Zone 3에는 극히 소수(2~4%)가 산재해 있었다(Table 2). 개개의 GST-P 양성변이소는 대부분 원형 혹은 난원형이었으며, 변이소 내부를 구성하는 간실질세포의 세포질에 미만성으로 강하게 염색됨으로써 주위 간조직과 대조하여 경계가 명확히 구분되었으나 압박소견은 볼 수 없었다(Fig. 3 & 4). 변이소의 구성세포는 모든 예에서 정상 간세포에서 볼 수 있는 방사상 단일 층판배열을 소실하고 있었으며, 다수의 세포가 여러층으로 불규칙하게 배열되어 한 덩어리를 이루고 있었다.

한편 AFB₁을 투여한 전실험군의 H&E 염색표본에서 이미 Newberne과 Wogan¹⁸⁾에 의하여 기술된 바 있는 증식성 호염기성세포군(hyperplastic basophilic cells)을 다초점성으로 관찰할 수 있었으나(Fig. 5), 이에 대한 GST-P 염색 결과는 음성이었다.

3. GST-P 양성변이소의 정량적 계속

비디오영상분석기를 통하여 최대직경이 0.2 mm보다 큰 GST-P 양성변이소를 계속한 다음, 여기서 변



- Fig. 2.** Eosinophilic cell focus(arrows) induced in the rat liver by diethylnitrosamine and aflatoxin B₁. Notice the focus that stands out clearly against the adjacent normal parenchyma.
- Fig. 3.** Immunohistochemical demonstration of GST-P positive foci induced in the rat treated with aflatoxin B₁ in diethylnitrosamine-initiated liver. (ABC, $\times 40$ & $\times 100$)
- Fig. 4.** Higher magnification of Fig. 3 revealing diffuse staining of the cytoplasm of the hepatocytes. (ABC, $\times 400$)
- Fig. 5.** Hyperplastic area of basophilic cells(arrows) observed in the rat liver exposed to aflatoxin B₁. Notice deeply basophilic cytoplasm with hematoxylin staining.

Table 2. Histopathologic characteristics of GST-P⁺ foci in each experimental group

Group	Treatment (mg/kg)	GST-P ⁺ foci(%)									
		CCF	ECF	MCF	Acinar Distribution			NE	NAtp	CE	CInc
					Z-I	Z-II	Z-III				
1	DEN + AFB ₁ 0.06	3.23	35.48	61.29	30.14	67.81	2.05	9.68	6.45	100	10.75
2	DEN + AFB ₁ 0.012	1.51	7.58	90.91	18.75	77.68	3.57	6.06	6.06	100	13.64
3	DEN + AFB ₁ 0.0024	-	15.00	85.00	15.24	80.95	3.81	-	-	100	-
4	DEN + AFB ₁ 0.00048	-	9.26	90.74	18.05	77.78	4.17	-	-	100	-
5	DEN + AFB ₁ 0.000096	-	3.92	96.08	21.31	77.05	1.64	-	-	100	-
6	DEN + DGA 100	-	1.89	98.11	21.67	78.33	-	-	-	100	-
7	DEN	-	4.76	95.24	12.50	87.50	-	-	-	100	-
8	SAL + AFB ₁ 0.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	SAL + DGA 100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DEN; Diethylnitrosamine, AFB₁; Aflatoxin B₁, DGA; D-galactosamine, SAL; Saline
 CCF; Clear cell foci, ECF; Eosinophilic cell foci, MCF; Mixed cell foci
 NE; Nuclear enlargement, NAtp; Nuclear atypism
 CE; Cytoplasmic enlargement, CInc; Cytoplasmic inclusion

Table 3. Promoting effect of Aflatoxin B₁ and D-galactosamine expressed by number and area of GST-P⁺ foci

Group	Treatment (mg/kg)	Number of rats	GST-P ⁺ foci ^a		
			No./cm ²	Area ^b (mm ²)/cm ²	Mean diameter(mm)
1	DEN + AFB ₁ 0.06	9	15.63±8.98**	12.47±1.93***	0.37±0.05
2	DEN + AFB ₁ 0.012	9	11.95±5.22***	7.67±1.45***	0.37±0.06
3	DEN + AFB ₁ 0.0024	8	10.78±3.08***	5.85±0.78***	0.36±0.09
4	DEN + AFB ₁ 0.00048	10	7.34±3.68**	4.73±0.73***	0.32±0.05
5	DEN + AFB ₁ 0.000096	11	4.13±1.80	4.22±0.16***	0.33±0.05
6	DEN + DGA 100	9	5.06±2.62	0.86±0.05***	0.32±0.04
7	DEN	9	3.35±1.01	0.37±0.04	0.34±0.05
8	SAL + AFB ₁ 0.06	12	0	0	-
9	SAL + DGA 100	13	0	0	-

^aMean±Standard deviation

^bSignificantly different from each other group at p<0.01

*Statistically increased compared to group 7 at p<0.001(***), 0.01(**) or 0.05(*).

이소의 평균 최대직경, 절편 슬라이드 cm²당 수 (number/cm²) 및 면적(area(mm²)/cm²)으로 산출한 결과를 Table 3에 요약하였다. 절편 채취부위에 따른 변이소 출현빈도에는 큰 차이가 없었다. 농도별로 AFB₁을 투여한 실험군에서 절편 슬라이드 cm²당 변이소의 수는 제 1 군에서 15.63±8.98, 제 2 군에서 11.95±5.22, 제 3 군에서 10.78±3.08, 제 4 군에서 7.34±3.68, 제 5 군에서 4.13±1.80으로 DEN 단독투여대조군(3.35±1.01)과 비교했을 때, 제 5 군을 제외한 제 1~4 군에서 상당히 유의한 증가가 있었다(p<

0.01 or p<0.001). 또한 절편 슬라이드 cm²당 변이소의 면적은 제 1 군에서 12.47±1.93, 제 2 군에서 7.67±1.45, 제 3 군에서 5.85±0.78, 제 4 군에서 4.73±0.73, 제 5 군에서 4.22±0.16으로 DEN 단독투여대조군(0.37±0.04)과 비교했을 때, 모두에서 상당히 유의한 수준의 증가를 보였다(p<0.001). 한편 초발인자로 DEN을 투여하지 않고 AFB₁만 준 제 8 군에서는 최대직경이 0.2 mm보다 작은 GST-P 양성변이소가 초점성으로 산재해 있었다.

DGA를 투여한 제 6 군에서 절편 슬라이드 cm²당

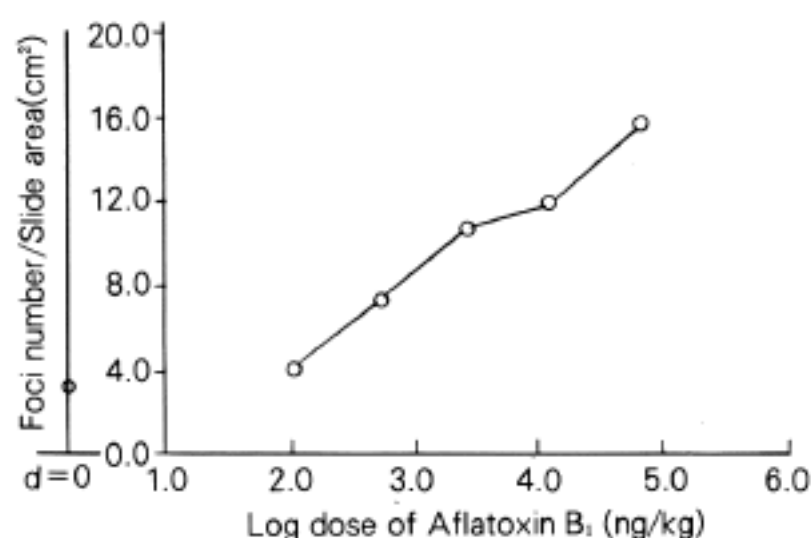


Fig. 6. The enhancing potential (foci number) of Aflatoxin B₁ on induction of GST-P⁺ foci.

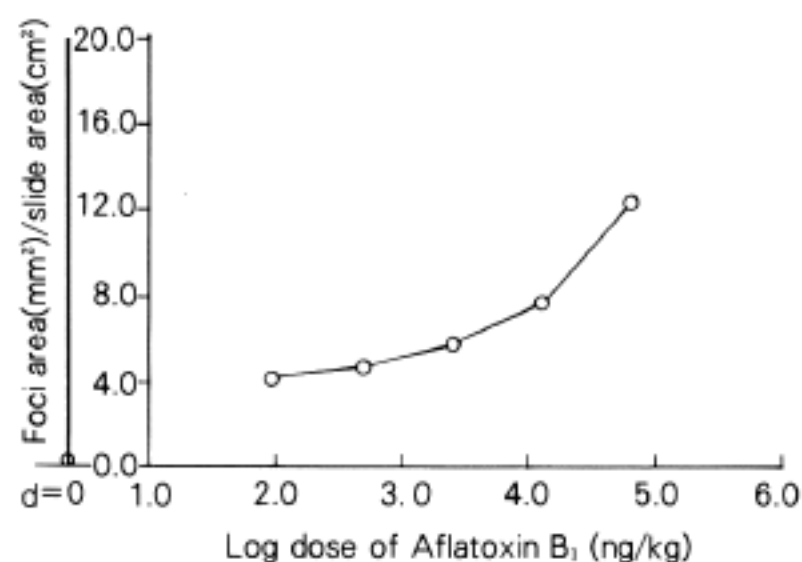


Fig. 7. The enhancing potential (foci area) of Aflatoxin B₁ on induction of GST-P⁺ foci.

변이소의 수는 5.06 ± 2.62 로 DEN 단독투여대조군에서의 3.35 ± 1.01 과 비교했을 때 유의한 수준의 증가가 없었으나 ($p > 0.05$), 절편 슬라이드 cm²당 면적은 0.86 ± 0.05 로 DEN 단독투여대조군 (0.37 ± 0.04)에 비해 상당히 유의한 수준의 증가를 보였다 ($p < 0.001$). 한편 처음에 DEN을 투여하지 않고 DGA만 준 제 9군에서는 아무런 변이소도 발견되지 않았다.

고 찰

각종 화학물질들의 간발암 수식효과를 규명하고자 할 때 Solt-Farber의 간암유도모델⁷⁾은 전암성병변으로 알려진 효소변이소 혹은 증식성결절을 비교적 단기간 내에 유도해낼 수 있다는 장점 때문에 screening test로서의 유용성이 확인된 바 있다³⁻⁶⁾. 또한 이 전암성병변의 지표로서 본 연구에 적용한 GST-P는 기

왕에 연구되어 온 GGT^{2,7)}와 더불어 높은 조직내 발현이 인정되고 있다. GST는 발암제를 비롯한 각종 화학물질들 또는 체내에서 생성되는 steroid와 같은 지용성산물들과 결합하여 이들을 불활성화시키고, 배설 및 해독작용을 구현하는 결합효소로서³⁷⁻³⁹⁾, 화학적 발암제로 유발된 동물간암모델에서 그 활성화와 발현이 증가한다고 알려져 있다. 특히 전암성병변 또는 간세포암 조직내에서는 그 산성 isozyme인 GST-P의 높은 조직내 발현이 면역조직화학적으로 입증된 바 있다^{10-15, 40)}.

본 연구에서도 이러한 측면에서 AFB₁과 DGA의 간발암 수식효과를 검증하고자 Solt-Farber의 간암유도모델⁷⁾을 약간 수정하여 DEN 200 mg/kg 용량을 복강내 1회 주입한 다음, 2주후부터 AFB₁ 또는 DGA를 각각 6주동안 주 5회 매일 투여하고, 제 3주에 증식성자극을 유발하기 위하여 부분적간절제술을 시행한 후 제 8주에 희생시키는 방식을 택하였다. 또한 대조군의 설정은 처음에 DEN만 투여하고 실험대상화합물을 투여하지 않은 경우와 처음에 DEN 대신 saline을 주입한 후 각각의 실험대상화합물을 투여한 경우의 3개의 실험군으로 정하였다. 첫번째 대조군의 경우 초발인자로 DEN 200 mg/kg 용량만 투여해도 기왕의 연구보고들에서 8주후에는 전암성병변인 효소변이소가 발생한다고 하였으므로 실험대상화합물의 촉진작용뿐만 아니라 억제효과도 판정할 수 있을 것으로 사료되었다. 나머지 2개의 대조군을 추가로 선정한 이유는 특히 AFB₁의 경우 기왕의 연구에서 초발인자로서의 강력한 간발암성이 입증된 바 있으나, 촉진인자로서의 간발암효과가 인체에서 의심이 됨에도 불구하고 실험적인 방법으로 체계화되어 있지 않으므로, 촉진단계에서의 간발암 수식효과를 판정하기 위해 반드시 필요하다고 판단되었다.

본 실험에서 AFB₁ 또는 DGA의 투여 용량이 흰쥐의 평균 체중 및 생존율에 미치는 영향을 고려해 볼 때 (Table 1), 대조군을 포함한 전실험군에서 평균 체중이 유의한 수준의 차이가 없는 것으로 판단되었다. 또한 흰쥐의 생존율은 50~61% 정도로 비교적 낮았으나 대조군을 포함한 전실험군 간에 유의한 차이가 없는 것으로 미루어 흰쥐의 사망율과 AFB₁ 또는 DGA 투여로 인한 치명사와는 인과관계가 없는 것으로 판단되었으며, 더우기 흰쥐 (체중 100 gm)에서의 AFB₁의 50% 치사량이 6~7 mg/kg임에⁴¹⁾ 비추어 본 실험에서의 AFB₁의 총투여량은 전실험군에서 이에 훨씬 미달함이 이를 뒷받침해 주리라 본다. 그 보다는 부분적간절제술시의 마취사고, 수술후 합병증 등이 주요사인이었음을 밝혀둔다.

가토 항-흰쥐 GST-P 항체를 이용하여 조직내 GST-P 발현부위를 ABC 방법에 의하여 면역조직화학적으로 검색한 결과, GST-P가 선택적으로 발현되는 GST-P 양성변이소가 주위 간조직과 뚜렷한 대조

결 론

를 이루고 있었으며, 이를 동일 절편에서 시행한 H&E 염색과 비교해 본 결과 투명세포변이소, 호산성세포변이소 및 혼합세포변이소 등과 일치하고 있었다. 특 GST-P는 동물 간암유도모델에서 전암성병변인 효소변이소에만 선택적으로 발현되고, 대조 비암성 간조직에서는 나타나지 않았고 이는 기왕의 연구보고들과 일치하고 있다.

이 전암성병변의 최대직경, 절편 슬라이드 cm²당 수 및 면적(mm²)을 비데오영상분석기를 통하여 측정하여 대조군과 비교한 결과(Table 3), AFB₁ 투여군에서는 DEN 단독투여대조군에 비해 GST-P 양성변이소의 절편 슬라이드 cm²당 수 및 면적 모두에서 상당히 유의한 수준의 증가를 보임으로써 (p<0.001), 강력한 간발암 촉진인자로 작용함을 시사하고 있다. 또한 AFB₁의 간발암 항진효과는 실험군의 농도의 대수치 의존성 비례관계를 보였다(Fig. 6 & 7). 처음에 DEN을 주지 않고 AFB₁만 투여한 대조군에서는 최대직경이 0.2 mm 이하인 GST-P 양성변이소만 관찰되었던 점을 고려할 때, AFB₁은 그 자체만으로는 간 발암에 도달하지 않는 극히 미량으로도 일단 초발과정이 일어난 간에 장기간 지속적으로 투여시 강력한 간 발암 항진효과를 나타내는 것으로 해석할 수 있다. 이러한 사실은 Wogan과 Newberne¹⁷⁾의 연구보고에서 AFB₁을 사료에 1.0 ppm 비율로 섞어 2주간 연속적으로 투여해도(그 총투여량은 본 실험의 제 2 실험군과 비슷하나) 18주까지 본 실험의 효소변이소에 해당하는 이행세포들(transitional cells)이 출현하지 않았던 것과 대조를 이루고 있다. 인체 간세포암종 증례의 절제간을 광학현미경으로 검토하는 과정 중 실험동물에서와 같은 효소변이소에 닮은 병변이 비암성 간조직에서 드물지 않게 관찰되고 있는 점을 감안할 때⁴²⁾, 선종성과증식을 통한 간세포암종 전환⁴³⁾이외에 효소변이소 단계를 거치는 간세포암종 발생이 인체에서도 가능하다면, 본 연구의 성적은 추후 비-HBV성 내지는 HBV-유도 간세포암종 발생에 대한 AFB₁의 항진역할을 시사해 주고 있다.

DGA도 DEN 단독투여대조군에 비해 GST-P 양성변이소의 절편 슬라이드 cm²당 수의 증가는 보이지 않았으나 면적에 있어서는 상당히 유의한 증가를 초래함으로써(p<0.001), 증폭과정을 통한 간발암 촉진작용이 있음을 입증하고 있다.

앞으로 본 연구를 확대하여 장기간에 걸친 간암유도 모델에서 AFB₁과 DGA의 효소변이소 단계를 거치는 증식성결절 및 간세포암종 발생을 상승 유무를 검토하고 본 실험 결과와 비교함으로써 이들 촉진인자의 간세포에 대한 직접적인 발암과정을 확인할 필요가 있다고 생각된다.

강력한 간독성 및 간발암성을 가지고 있는 aflatoxin B₁(AFB₁)과 심한 간괴사 작용을 나타내는 D-galactosamine(DGA)의 촉진인자로서의 간발암 수식효과를 규명하고자 Solt-Farber 간암유도모델⁷⁾을 약간 수정하여 DEN + AFB₁ 또는 DGA + 부분적간절제술의 발암방식으로 흰쥐에 나타나는 전암성 대반형 glutathione S-transferase(GST-P) 양성변이소의 발현현상을 관찰하였다.

AFB₁은 제 1~5 전실험군(96 ng/kg부터 60 μg/kg 사이의 농도)에서 DEN 단독투여대조군에 비해 GST-P 양성변이소의 절편 슬라이드 cm²당 수 및 면적 모두에서 상당히 유의한 수준의 증가를 초래함으로써(p<0.001) 강력한 간발암 항진효과를 나타내었고, 항진정도는 (96 ng/kg부터 60 μg/kg 사이에서) 농도의 대수치 의존성 비례관계에 있었다. DGA는 DEN 단독투여대조군에 비해 GST-P 양성변이소의 절편 슬라이드 cm²당 수의 변화는 나타나지 않았으나, 면적에 있어서는 상당히 유의한 수준의 증가를 초래함으로써(p<0.001) 간발암 촉진인자로 작용하였다.

이상의 결과로 미루어 AFB₁은 그 자체만으로는 간 발암에 도달하지 않는 극히 미량을 장기간 지속적으로 투여할 때 기타 다른 발암인자에 의하여 일단 초발현상이 일어난 간에 강력한 간발암 항진효과가 있음을 시사하였다.

또한 미지의 각종 화학물질들의 간발암 수식효과를 규명하고자 할 때 DGA를 촉진인자로서 동물실험모델에 적용하면 그 효용성을 높여주리라 기대된다.

참 고 문 헌

- 1) Ito N, Tatematsu M, Nakanishi K, et al. *The effects of various chemicals on the development of hyperplastic liver nodules in hepatectomized rats treated with N-nitrosodiethylamine or N-2-fluorenylacetamide.* Gann 1980; 71: 832-42.
- 2) Tsuda H, Hasegawa R, Imaida K, et al. *Modifying potential of thirty-one chemicals on the short term development of glutamyl transpeptidase-positive foci in diethylnitrosamine-initiated rat liver.* Gann 1984; 75: 876-83.
- 3) Ogiso T, Tatematsu M, Tamano S, et al. *Comparative effects of carcinogens on the induction of placental glutathione S-transferase positive liver nodules in a short-term assay and of hepatocellular carcinomas in a long-term assay.* Toxicol Pathol 1985; 13: 257-65.
- 4) Goldsworthy TL, Hanigan MH, Pitot HC. *Models of hepatocarcinogenesis in the rat; Contrasts and*

- comparisons. *CRC Crit Rev Toxicol* 1986; 17: 61-89.
- 5) Hasegawa R, Furukawa F, Toyoda K, et al. Study for tumor-initiating effect of acetaminophen in two-stage liver carcinogenesis of male F344 rats. *Carcinogenesis* 1988; 9: 755-59.
 - 6) Ito N, Tsuda H, Tatematsu M, et al. Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats; An approach for a new medium-term bioassay system. *Carcinogenesis* 1988; 9: 387-94.
 - 7) Solt DB, Medline A, Farber E. Rapid emergence of carcinogen induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis. *Am J Pathol* 1977; 88: 595-601.
 - 8) Pitot HC, Sirica AE. The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1980; 605: 191-215.
 - 9) Rabes HM. Developmental growth of early preneoplastic lesions induced in the liver by chemical carcinogens. *J Cancer Res Clin Oncol* 1983; 106: 85-94.
 - 10) Sato K, Kitahara A, Satoh K, et al. The placental form of glutathione S-transferase as new marker protein for preneoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis. *Gann* 1984; 75: 199-202.
 - 11) Satoh K, Kitahara A, Soma Y, et al. Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase; A new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 3964-8.
 - 12) Soma Y, Satoh K, Sato K. Purification and subunit-structural and immunological characterization of five glutathione S-transferases in human liver, and the acidic form as a hepatic tumor marker. *Biochim Biophys Acta* 1986; 869: 247-58.
 - 13) Rushmore TH, Farber E. Identification of a characteristic cytosolic polypeptide of rat preneoplastic hepatocyte nodules as placental glutathione S-transferase. *Biochim Biophys Res Commun* 1987; 143: 98-103.
 - 14) Tatematsu M, Tsuda H, Shirai T, et al. Placental glutathione S-transferase(GST-P) as a new marker for hepatocarcinogenesis; In vivo short-term screening for hepatocarcinogens. *Toxicol Pathol* 1987; 15: 60-8.
 - 15) Sato K. Glutathione S-transferases and hepatocarcinogenesis; A review. *Gann* 1988; 79: 556-72.
 - 16) Wogan GN. Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. *Bacteriol Rev* 1966; 30: 460-70.
 - 17) Wogan GN, Newberne PM. Dose-response characteristics of aflatoxin B₁ carcinogenesis in the rat. *Cancer Res* 1967; 27: 2370-6.
 - 18) Newberne PM, Wogan GN. Sequential morphologic changes in aflatoxin B₁ carcinogenesis in the rat. *Cancer Res* 1968; 28: 770-81.
 - 19) Newberne PM, Butler WH. Acute and chronic effects of aflatoxins on the liver of domestic and laboratory animals; A review. *Cancer Res* 1969; 29: 236-50.
 - 20) Wogan GN, Edwards GS, Newberne PM. Structure-activity relationships in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs. *Cancer Res* 1971; 31: 1936-42.
 - 21) Newberne PM. Experimental hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res* 1976; 36: 2573-8.
 - 22) Neal GE, Cabral JRP. Effect of partial hepatectomy on the response of rat liver to aflatoxin B₁. *Cancer Res* 1980; 40: 4739-43.
 - 23) Moore MA, Nakagawa K, Ishikawa T. Selection pressure and altered hepatocellular islands after a single injection of aflatoxin B₁. *Gann* 1988; 79: 187-94.
 - 24) Beasley RP. Hepatitis B virus; The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1988; 61: 1942-56.
 - 25) Jackson CD, Irving CC. Effects of 2-acetylaminofluorene on liver cell proliferation after partial hepatectomy of female rats. *Cancer Res* 1973; 33: 397-401.
 - 26) Pound AW, McGuire LJ. Repeated partial hepatectomy as a promoting stimulus for carcinogenic response of liver to nitrosamines in rats. *Br J Cancer* 1978; 37: 585-94.
 - 27) Emmelot P, Scherer E. The first relevant cell stage in rat liver carcinogenesis; A quantitative approach. *Biochim Biophys Acta* 1980; 605: 247-304.
 - 28) Tsuda H, Lee G, Farber E. Induction of resistant hepatocytes as a new principle for a possible short-term in vivo test for carcinogenesis. *Cancer Res* 1980; 40: 1157-64.
 - 29) Farber E. The sequential analysis of liver cancer induction. *Biochim Biophys Acta* 1980; 605: 149-66.
 - 30) Reutter W, Decker K. Glucosaminstoffwechsel bei der Aminonucleosid-Nephrose der Ratte. *Z Klin Chem* 1966; 4: 174-8.
 - 31) Keppler D, Lesch R, Reutter W, et al. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp Mol Pathol* 1968; 9: 279-90.
 - 32) Decker K, Keppler D. Galactosamine induced liver injury. In: Popper H, Fenton S. eds. *Progress in liver diseases*. New York & London. Grune & Stratton, 1972; 183-99.
 - 33) Shinozuka H, Farber JL, Konishi Y, et al. D-galactosamine and acute liver cell injury. *Federation Proc* 1973; 32: 1516-26.

- 34) Tsuda H, Masui T, Ikawa E, et al. *Compared promoting potential of D-galactosamine, carbon tetrachloride and partial hepatectomy in rapid induction of preneoplastic liver lesions in the rat.* *Cancer Lett* 1987; 37: 163-71.
- 35) Higgins GM, Anderson RM. *Experimental pathology of the liver; Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal.* *Arch Pathol* 1932; 12: 186-202.
- 36) Hsu SM, Raine L, Fanger H. *Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques; A comparison between ABC and unlabelled antibody PAP procedures.* *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-80.
- 37) Habig WH, Pabst MJ, Fleischner G, et al. *The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 3879-82.
- 38) Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. *Glutathione S-transferases; The first enzymatic step in mercapturic acid formation.* *J Biol Chem* 1974; 249: 7130-39.
- 39) Mannervik D. *The isozymes of glutathione transferase.* *Adv Enzymol* 1985; 57: 357-417.
- 40) Hendrich S, Pitot HC. *Enzymes of glutathione metabolism as biochemical markers during hepatocarcinogenesis.* *Cancer and Metastasis Reviews* 1987; 6: 155-78.
- 41) Butler WH. *Acute toxicity of aflatoxin B₁ in rats.* *Brit J Cancer* 1964; 18: 756-62.
- 42) Kim YI. *Demonstration of clear cell foci in human liver. Analysis of 250 resected hepatocellular carcinomas(Unpublished data).*
- 43) Anthony PP, Vogel CL, Barker LF. *Liver cell dysplasia: A premalignant condition.* *J Clin Pathol* 1973; 26: 217-23.
-